

インフルエンザAサブタイプH1,H2のHA2サブユニットによる感染防御的な細胞傷害性Tリンパ球の誘導

著者	桑野 剛一
号	2179
発行年	1990
URL	http://hdl.handle.net/10097/20405

氏 名（本籍）桑の野剛一

学 位 の 種 類医学博士

学 位 記 番 号医第2179号

学位授与年月日平成2年2月28日

学位授与の要件学位規則第5条第2項該当

最 終 学 歴昭和56年3月
熊本大学医学部卒業

学 位 論 文 題 目HA2 subunit of Influenza A H1 and H2 subtype
viruses induces a protective cross-reactive cyto-
toxic T lymphocyte response
（インフルエンザAサブタイプH1, H2のHA2サ
ブユニットによる感染防御的な細胞傷害性Tリン
パ球の誘導）

（主 査）

論文審査委員教授菅村和夫教授橘武彦

教授今野多助

論文内容要旨

インフルエンザAウイルスの刺激によって誘導される細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) は、ウイルス蛋白のうち、HA (hemagglutinin), NP (nucleoprotein), PB (polymerase), NS (nonstructural protein) 等を認識することが知られている。また、bulk cultureで誘導された抗インフルエンザCTLあるいは、NP特異的CTLクローンをインフルエンザ感染マウスへ受動移入することにより、肺のウイルス増殖を抑制し、さらに、マウスの生存期間を延長することが報告されている。

本研究はHAとNS 1 からなるfusion proteinの刺激により樹立したCTLクローンをを用いてインフルエンザ感染マウスにおけるHA特異的CTLの役割を検討することを目的とした。

【材料と方法】

1. HA fusion proteinは、A/PR/8 (H1) virus geneを遺伝子組換えにより、E. coliに発現させ産生した。NS 1 のN末端から81個のアミノ酸とHA 2 サブユニットを融合させた蛋白をc13 proteinとして、さらにHA 2 サブユニットのN末端から65個のアミノ酸を除いた蛋白をD proteinとした。
2. 二次CTLは、A/PR/8 ウイルスで免疫したマウスのspleenをA/PR/8 ウイルスあるいは、fusion proteinの刺激下に5日間培養することによって得た。
3. HA特異的CTLクローンは二次CTLをさらに、normal spleen cells, D proteinとIL 2 存在下に数週間培養後、限界希釈法によりCTLクローンを樹立した。
4. CTLアッセイは、P815細胞を標的細胞として⁵¹Crとウイルスとともに1時間培養後、CTLを加えて行なった。また、cold target inhibitionテストはCTLアッセイ系に⁵¹Cr非標識P815細胞を加えて行なった。
5. 受動移入。2 × 10⁶ CTLクローンをマウスの尾静脈より注入し、6時間後にマウスを経鼻的に感染させた。
6. 肺のウイルス定量。マウス感染後、3日目に肺を摘出し、ホモジナイズして、その上清中に含まれるウイルスをMDCK細胞を用いたプラーク形成法によって測定した。

【結 果】

1. c13 proteinまたはD proteinの刺激により誘導された二次CTLは、A/PR/8 virus (H1) 感染P815細胞を傷害したが、A/JAP (H2) 感染P815細胞または、A/PC (H3) 感染P815細胞

を傷害しなかった。

2. D proteinの刺激により樹立したCTLクローンはA/PR/8およびA/JAP感染P815細胞を傷害することはできなかった。すなわち、二次CTLと異なり、CTLクローンはサブタイプH1とH2を認識することができるcrossreactiveであることがわかった。

3. このCTLクローンがインフルエンザ感染時において、防御的に働くか調べるために、感染マウスに対してクローンの受動移入を行なった。移入により、肺におけるA/PR/8およびA/JAPのウイルス量は、CTLクローン非投与群に比べて有意の減少を認めた。しかし、A/PCまたはB/HKのウイルス量は対照群と比較して有意の差を認めなかった。

4. c13 proteinとD proteinにおけるCTLエピトープを調べるために、cold target inhibition testを行なった。CTLクローンによる⁵¹Cr標識c13 protein処理または、A/PR/8感染P815細胞の傷害は、⁵¹Cr非標識A/PR/8感染P815細胞、c13 proteinまたはD protein処理P815細胞の存在下で抑制された。

【考 察】

本研究で、HA2サブユニット上のcross-reactiveエピトープを含むfusion proteinによって刺激されたCTLクローンがインフルエンザサブタイプH1またはH2のウイルス増殖を有意に抑制することを明らかにした。

bulk cultureで、D proteinの刺激によって誘導されたCTLはサブタイプH1特異的であったが、D proteinの長期刺激によって樹立したCTLクローンは、サブタイプH1とH2のcross-reactivityを示していた。D proteinの構成より、サブタイプH1とH2に共通なCTLエピトープはHA2サブユニットのC末端から157個のアミノ酸上に存在することが推定された。その後、合成ペプチドを用いたCTLアッセイでエピトープはHA上の518-528に存在することを観察した(参考論文2)。

これらのことから、cross-reactive CTLエピトープを含むprotein (Antigen)の免疫によって、インフルエンザサブタイプH1、H2に対する感染防御が期待された(参考論文1)。感染時のCTLの役割について、CTLは肺病変を惹起する報告はあるが、しかし、回復期にCTLはウイルス増殖抑制に働くことが認められている。従って、本結果は、従来の液性免疫誘導による感染防御と異なる細胞性免疫、とりわけcross-reactive CTLによる感染防御を誘導する新しいワクチン開発の可能性を示唆していると思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、インフルエンザ蛋白であるHAとNSIからなるfusion proteinの刺激により樹立したCTLクローンをを用いてインフルエンザ感染マウスにおけるHA特異的CTLの役割について検討した論文である。

インフルエンザAウイルスの刺激によって誘導される細胞傷害性Tリンパ球（CTL）は、ウイルス蛋白のうち、HA、NP、PB、NS等を認識することが知られている。また、bulk cultureで誘導された抗インフルエンザウイルスCTLあるいは、NP特異的CTLクローンをインフルエンザ感染マウスへ受動移入することにより、マウスの生存期間を延長することが報告されている。しかし、HA特異的CTLのインフルエンザ感染時におけるin vivoでの役割は、まだ明らかでない。従って、major antigenであるHAに特異的なCTLのin vivoにおける役割の解明は重要である。本論文では特に以下の2つの課題を中心に研究を行なっている。1. 合成蛋白であるインフルエンザ蛋白のHAとNSIからなるfusion proteinの刺激によってHA特異的CTL（クローン）を樹立できるか。2. 上記で樹立されたHA特異的CTLクローンをマウスに受動移入して、インフルエンザ感染を防御できるか。

これらの研究の新知見として、1. fusion proteinの刺激により誘導された二次CTLはA/PR/8 virus (HA1) 感染P815細胞を傷害したがA/JAP (H2) 感染P815細胞または、A/PC (H3) 感染P815細胞を傷害しなかった。2. fusion proteinの刺激により樹立したCTLクローンはA/PR/8およびA/JAP感染P815細胞を傷害した。しかし、A/PCまたはB/HK感染P815細胞を傷害することはできなかった。すなわち二次CTLと異なり、CTLクローンはサブタイプH1とH2を認識することができるcross-reactiveであることがわかった。また、recombinant influenza virus 感染P815細胞を用いてこのCTLクローンはHA特異的であることを認めた。3. このクローンのインフルエンザ感染マウスへの受動移入により、肺におけるA/PR/8および、A/JAPのウイルス量は、CTLクローン非投与群に比べて、有意の減少を認めた。しかし、A/PCまたはB/HKのウイルス量は対照群と比較して有意の差を認めなかった。以上の点が明らかにされた。

HA上のcross-reactiveエピトープを含むfusion proteinの刺激によって樹立したHA特異的CTLクローンがインフルエンザ感染に対して防御的に働くことを発見したことは、インフルエンザ感染のみならず、他のウイルス感染研究に大きく寄与すると考えられる。すなわち、従来のウイルス感染時における液性免疫誘導による感染防御と異なる細胞性免疫、とりわけcross-reactive CTLによる感染防御を誘導する新しいワクチン開発の可能性を示唆しているからである。従って、本論文は博士号授与に値する研究と見なす。